



B12

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Off nl gungsschrift**
⑩ **DE 199 29 364 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/34
C 12 N 15/53
C 12 N 1/21

②1 Aktenzeichen: 199 29 364.3
②2 Anmeldetag: 25. 6. 1999
④3 Offenlegungstag: 28. 12. 2000

DE 199 29 364 A 1

⑦1 Anmelder:
BASF-LYNX Bioscience AG, 69120 Heidelberg, DE

⑦2 Erfinder:
Mack, Matthias, Dr., 69120 Heidelberg, DE;
Herbster, Karin, 76694 Forst, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤4 Die Sequenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Einsatz bei der mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen
- ⑤7 Die vorliegende Erfindung besteht aus Nucleotidsequenzen eines Gens (pyrD) für die Pyrimidinbiosynthese aus *Corynebacterium glutamicum* und ihrem Einsatz zur mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen.

DE 199 29 364 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit dem Produktionsprozeß von Pyrimidinen durch Fermentation mit Hilfe eines gentechnisch veränderten Organismus. Diese Erfindung besteht in der Sequenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Einsatz zur mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen und/oder von mit Pyrimidin verwandten Verbindungen.

Der Biosyntheseweg für Pyrimidine ist für alle lebenden Organismen essentiell (ein Übersichtsartikel hierzu findet sich von Switzer, R.L. und Quinn, C.L. in *Bacillus subtilis* (Hrsg.: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. und Losick, R., American Society for Microbiology, Washington, D.C.), 1993, S. 343–358. Die Pyrimidinnucleotide sind Pyrimidinderivate und als solche aktivierte Vorstufen der DNA und RNA und für viele Biosynthesewege. In den Pyrimidinnucleosiden Cytidin, Uridin, Deoxycytidin und Deoxythymidin ist eine Pyrimidinbase an eine Pentose gebunden, die Pyrimidinnucleotide sind die Phosphatester der Pyrimidinnucleoside. Pyrimidinnucleoside und Pyrimidinnucleotide und deren Derivate sind auch wichtige Ausgangsverbindungen zur Synthese wertvoller Arzneimittel, wie z. B. CDP-Cholin, Orotsäure oder UMP (ein Übersichtsartikel hierzu gibt es von Kuninaka, A. in *Biotechnology*, Vol. 6 (Hrsg.: Rehm, H.-J. und Reed, G.), VCH, Weinheim, Deutschland, 1996, S. 561–612).

Viele, aber nicht alle Mikroorganismen können ihre Pyrimidinnucleotide sowohl de novo als auch aus von außen angebotenen Pyrimidinbasen und Pyrimidinnucleosiden synthetisieren. Pyrimidinbasen und/oder Pyrimidinnucleoside kommen normalerweise nicht intrazellulär vor. Sie können jedoch unter manchen Wachstumsbedingungen im Überschuß gebildet werden und werden dann in das Kulturmedium ausgeschieden. Darum lassen sich Mikroorganismen zur fermentativen Produktion von Pyrimidinnucleotiden und/oder verwandten Verbindungen einsetzen.

Die Biosyntheseleistung der Mikroorganismen für Pyrimidinnucleotide läßt sich durch gentechnische Veränderung des Pyrimidinbiosynthesewegs optimieren. Gentechnische Veränderung bedeutet hierbei, daß die Anzahl der Genkopien und/oder die Geschwindigkeit der Transkription der Gene für den Pyrimidinsyntheseweg erhöht wird. Als Folge hiervon steigt der Anteil an Genprodukt und die intrazelluläre enzymatische Aktivität. Eine erhöhte enzymatische Aktivität führt zu einer vermehrten Umwandlung von im Nährmedium angebotenen Verbindungen zu Pyrimidinnucleotiden und/oder verwandten Verbindungen und steigert so die Syntheseleistung. So konnte man zeigen, daß z. B. ein Anstieg der Aktivität der Dihydroorotat-Dehydrogenase, die die Oxidation von (S)-Dihydroorotat zu Orotat katalysiert – dies ist die vierte Stufe bei der de novo Pyrimidinbiosynthese für Pyrimidinnucleotide – die UMP-Syntheseleistung in *Corynebacterium ammoniagenes* erhöht (Nudler, A.A. Garibyan, A.G. und Bourd, G.I. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 82: 263–266).

Die Erfindung befaßt sich mit dem neuen pyrD-Gen für die Dihydroorotat-Dehydrogenase des Pyrimidinbiosynthesewegs aus *Corynebacterium glutamicum* und seinem Einsatz zur Herstellung von Pyrimidinnucleotiden und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen.

Ein Teil der Erfindung besteht in dem pyrD-Genprodukt. Die SEQ ID NR. 2 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das pyrD-Gen kodiert ein Polypeptid aus 322 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33953. Die vorliegende Erfindung befaßt sich aber auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 2 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 25% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 15%. Der Ausdruck funktionelles Derivat bedeutet, daß die Enzymaktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 2.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in den Polynucleotidsequenzen, die die oben beschriebenen Polypeptide kodieren. Die Polynucleotidsequenzen lassen sich ausgehend von Sequenzen, die man aus *Corynebacterium glutamicum* isoliert (d. h. SEQ ID NR. 1), erzeugen, in dem man diese Sequenzen durch ortsgerichtete Mutagenese modifiziert oder nach Rückübersetzung des entsprechenden Polypeptids mit dem genetischen Code eine chemische Totalsynthese ausführt.

Diese Polynucleotidsequenzen können am besten in Form von Genkonstrukten zur Transformation von Wirtsorganismen, vorzugsweise von Mikroorganismen, eingesetzt werden. Diese Genkonstrukte bestehen zumindest aus einer Kopie eines der Polynucleotide zusammen mit zumindest einer regulatorischen Sequenz. Regulatorische Sequenzen umfassen Promotoren, Terminatoren, Verstärker und ribosomale Bindungsstellen.

Bevorzugte Wirtsorganismen für die Transformation mit diesen Genkonstrukten sind *Corynebacterium*- und *Bacillus*-Arten, auch jeden eukaryontischen Mikroorganismus kann man dafür einsetzen, vorzugsweise Hefestämme der Gattung *Ashbya*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* und *Hansenula*.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht im Herstellungsprozeß für Pyrimidine und Pyrimidinderivate mit Hilfe der Kultivierung eines Wirtsorganismus, der in der oben beschriebenen Art transformiert ist, und in der nachfolgenden Isolierung der Pyrimidine. Unter einem Pyrimidinderivat versteht man eine Verbindung mit einem Pyrimidinring, das sich dadurch herstellen läßt, daß man einen Wirtsorganismus mit einem der der hier vorliegenden Erfindung entsprechenden Polynucleotide transformiert.

Die Verfahren und Vorgehensweisen zur Kultivierung von Mikroorganismen und zur Isolierung von Pyrimidinen aus einer mikrobiellen Produktion sind dem geschulten Personal geläufig.

Die folgenden Beispiele beschreiben, wie die Erfindung entstand und ihre Anwendung bei der gentechnischen Veränderung von Mikroorganismen zur erhöhten Produktionsleistung von Pyrimidinnucleotiden und/oder verwandten Verbindungen.

Beispiel 1

Darstellung einer Genombibliothek aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

DNA aus dem Genom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 läßt sich nach Standardmethoden gewinnen, die bereits beschrieben sind, z. B. von J. Altenbuchner und J. Cullum (1984, *Mol. Gen. Genet.* 195: 134–138). Die Ge-

DE 199 29 364 A 1

nombibliothek läßt sich nach Standardvorschriften (z. B.: Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) mit einem beliebigen Klonierungsvektor herstellen, z. B. pBluescript II KS- (Stratagene) oder ZAP ExpressTM (Stratagene). Dabei kann man jede beliebige Fragmentgröße benutzen, vorzugsweise Sau3AI-Fragmente mit einer Länge von 2–9 kb, die sich in Klonierungsvektoren mit verdautem BamHI einbinden lassen.

5

Beispiel 2

Analyse der Nucleinsäuresequenz der Genombibliothek

10

Einzelne E. coli-Klone kann man aus der im Beispiel 1 dargestellten Genombibliothek auswählen. E. coli-Zellen werden nach Standardverfahren in geeigneten Medien kultiviert (z. B. LB ergänzt mit 100 mg/l Ampicillin), und danach läßt sich die Plasmid-DNA isolieren. Klont man Genomfragmente aus der DNA von Corynebacterium glutamicum in pBluescript II KS- (siehe Beispiel 1), läßt sich die DNA mit Hilfe der Oligonucleotide 5'-AAITTAACCCCTCAC-TAAAGGG-3' und 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' sequenzieren.

15

Beispiel 3

Computeranalyse der Sequenzen der isolierten Nukleinsäuren

20

Die Nucleotidsequenzen lassen sich z. B. mit Hilfe des BLASTX-A1-gorithmus (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403–410) aneinanderfügen. Auf diesem Weg kann man neuartige Sequenzen entdecken und die Funktion dieser neuartigen Gene aufklären.

Beispiel 4

25

Identifizierung eines E. coli-Klons, der das Gen für die Dihydroorotat-Dehydrogenase (EC 1.3.3.1) enthält

Bei der Analyse der E. coli-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 1 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit der Dihydroorotat-Dehydrogenase (PyrD; EC 1.3.3.1) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus Mycobacterium leprae gegeben (SWISSPROT P46727; 67% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

30

Beispiel 5

Der Einsatz des Gens für die Dihydroorotat-Dehydrogenase (pyrD) aus Corynebacterium glutamicum zur Produktion von Pyrimidin und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen

Das Gen für die Dihydroorotat-Dehydrogenase aus Corynebacterium glutamicum kann man mit Hilfe geeigneter Klonierungs- und/oder Expressionssysteme in das Corynebacterium glutamicum oder in einen beliebigen anderen Mikroorganismus einführen. Es lassen sich gentechnisch veränderte Mikroorganismen herstellen, die sich vom Wildtyp in der Aktivität oder der Anzahl der Kopien der Gene unterscheiden. Diese neuartigen, gentechnisch veränderten Stämme kann man zur Produktion von Pyrimidin und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen einsetzen.

40

50

55

60

65

(I) Allgemeine Angaben

5 (1) Anmelder:

(A) Name: BASF-LYNX Bioscience AG
10 (B) Straße: Im Neuenheimer Feld 515
(C) Stadt: Heidelberg
(D) Land: Deutschland
(E) Postleitzahl: 69120
15 (F) Telephon: 06221/4546
(G) Telefax: 06221/454770

20 (2) Titel: Die Sequenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus
Corynebacterium glutamicum und deren
Einsatz zur mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen
und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen

25

(3) Anzahl der Sequenzen: 2

30 (4) Art der vom Computer lesbaren Form:

(A) Datenträger: Diskette
(B) Computer: IBM PC kompatibel
35 (C) Betriebssystem: Windows NT
(D) Software: Microsoft® Word 97 SR-1

40 (I) Angaben zur SEQ ID NR. 1:

(1) Sequenzcharakteristika:

45 (A) Länge: 966
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strangtyp: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

50

(2) Art des Moleküls: DNA
(3) hypothetisch: nein
55 (4) Antisense: nein

60

65

(5) Herkunft:

(A) Organismus: *Corynebacterium glutamicum*

5

(6) Beschreibung der Sequenz: SEQ ID NR. 1:

ATGGAAAAATCATCGCAGTGCACGATGATTCCCTCTCCCAGGAAGTCTTCGGCGTCACCTTCCC 10
 ACGACCACTAGGCCTCGCCGAGGTTTCGACAAAAACGCATCAATGGCTGATGCCTGGGGTGCCG
 TTGGATTTCGGATACGCCGAACCTGGCACCGTCACCGCCTCCCCACAGCCAGGAAACCCACCCCG
 CGCCTTTTCCGCCTGCCTGCCGACAAAGCTATCTTGAACCGCATGGGATTCAACAACCTGGGTGC 15
 AGCAGAAGTCGCAAAAAACCTGCGCAACCGGAAATCCACCGATGTCATCGGCATCAACATCGGTA
 AAACCAAAGTGGTTCCTCGCTGAACACGCACTAGATGACTACCGCCGTTCTGCATCTTTGTTAGGT
 GATCTTGCTGATTACCTGGTTGTCAACGTTTCTCCCCAACACTCCGGGTCTCCGCGATCTGCA
 GGCTGTGGAATCTTTGCGACCAATCCTCGCCGAGTGCAGGAATCCACCACCGTCCCAGTCTTGG 20
 TGAAAATCGCACCAGACCTCTCCGACGAAGACATCGACGCCGTAGCTGACCTGGCAGTTGAGCTC
 AAACCTCGCCGGAATCGTAGCCACCAATACCACCATTTCCTCCGCGAAGGCCTCAACACTCCTTCAGG
 TGAAGTCGAAGCCATGGGTGCTGGCGGAATCTCCGGTGCTCCAGTAGCAGCCCGATCTTTGGAGG 25
 TACTCAAGCGCTCTACGCACGGGTAGGCAAAGAGATGGTGTGATCTCTGTGGTGGCATCAGC
 ACCCTGAGCAAGCCTGGGAACGCATCACCTCCGGCGCAACCCTTCTGCAGGGATACACCCCAT
 CATCTACGGTGGCCCCGATTGGATCAGAGATATCCACCTTGGTATCGCCAAGCAGCTGAAAGCTC
 ACGGTCTGCGCAACATCGCTGACGCTGTGGGCAGCGAATTGGAGTGGAAGAACTAA 30

(I) Angaben zur SEQ ID NR. 2:

(1) Sequenzcharakteristika:

35

(A) Länge: 322
 (B) Art: Aminosäure
 (C) Strangtyp: eine Kette
 (D) Topologie: linear

40

(2) Art des Moleküls: Aminosäure
 (3) hypothetisch: nein
 (4) Antisense: nein
 (5) Herkunft:

45

50

(B) Organismus: *Corynebacterium glutamicum*

(6) Beschreibung der Sequenz: SEQ ID NR. 2:

55

MEKIIAVHDDSLSQEVFGVTFPRPLGLAAGFDKNASMAWGAAGVFGYAE LGTVTASPQPGNPTP
 RLFRLPADKAILNRMGFNNLGAAEVAKNLRNRKSTDVIGINIGKTKVVP AEHAVDDYRRSASLLG 60
 DLADYLVVNVSSPNTPLRLDLQAVESLRPILAAVQESTTVPVLVKIAPDLSD EDIDAVALDEL
 KLAGIVATNTTISREGLNTPSGEVEAMGAGGISGAPVAARSLEVLKRLYARVGKEMVLISVGGIS
 TPEQAWERITSGATLLQGYTPFIYGGPDWIRDIHLGIAKQLKAHGLRNIADAVGSELEWKN

65

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid mit Dihydroorotat-Dehydrogenaseaktivität, das aus der folgenden Gruppe ausgewählt wurde:

DE 199 29 364 A 1

- (a) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, wie sie in der SEQ ID NR. 2 beschrieben ist,
- (b) ein Polypeptid, das im Vergleich zu (a) durch Deletion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.

- 2. Ein Polynucleotid, das ein dem Anspruch 1 entsprechendes Polypeptid kodiert.
- 3. Ein Genkonstrukt, das zumindest aus einer Kopie eines dem Anspruch 2 entsprechenden Polynucleotids zusammen mit zumindest einer regulatorischen Sequenz besteht.
- 4. Ein Wirtsorganismus, der mit einem dem Anspruch 3 entsprechenden Gen transformiert ist.
- 5. Ein Prozeß zur Produktion von Pyrimidinen und Pyrimidinderivaten, bei dem ein dem Anspruch 4 entsprechender Wirtsorganismus kultiviert und in der Folge das Pyrimidin oder das Pyrimidinderivat isoliert wird.

New *Corynebacterium glutamicum* dihydroorotate dehydrogenase polypeptide and corresponding DNA useful for creating pyrimidine-producing organisms

Patent Number: DE19929364
Publication date: 2000-12-28
Inventor(s): MACK MATTHIAS (DE); HERBSTER KARIN (DE)
Applicant(s): BASF LYNX BIOSCIENCE AG (DE)
Requested Patent: ☐ [DE19929364](#)
Application Number: DE19991029364 19990625
Priority Number(s): DE19991029364 19990625
IPC Classification: C07K14/34; C12N15/53; C12N1/21
EC Classification: [C07K14/34](#)
Equivalents: AU5685400, ☐ [EP1196602](#) (WO0100847), ☐ [WO0100847](#)

Abstract

A *Corynebacterium glutamicum* dihydroorotate dehydrogenase polypeptide (I) is new. (I) comprises a 322 residue amino acid sequence, fully defined in the specification, or its variant having deletions, insertions or substitutions. Independent claims are also included for the following: (1) a polynucleotide encoding (I); (2) a vector comprising at least one copy of the polynucleotide of (1) and at least one regulatory sequence; (3) a host organism transformed with a gene corresponding to the vector of (2); and (4) a process for producing pyrimidines and pyrimidine derivatives, comprising culturing the organism of (3).

Data supplied from the esp@cenet database - I2